

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan deskriptif, yang mencakup pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Tujuan dari pendekatan deskriptif adalah untuk memberikan gambaran yang akurat tentang fenomena yang ada. Dalam pendekatan kuantitatif, data yang dianalisis berupa angka, tetapi dalam pendekatan kualitatif, itu adalah uraian verbal (Atmowardoyo, 2018). Studi ini meneliti mikrobiota bakteri endofungal pada hifa jamur *P. ostreatus* dan potensi antibakteri ekstrak metabolit bakteri endofungal terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans*.

Penelitian ini terdiri atas tahap pra-penelitian dan tahap penelitian. Pra-penelitian terdiri dari persiapan alat dan bahan, pengamatan faktor klimatik tempat pengambilan sampel jamur, dan pengambilan sampel jamur.

Tahap penelitian meliputi isolasi bakteri endofungal jamur tiram, identifikasi morfologi bakteri secara makroskopis, pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, uji biokimia, seleksi isolat bakteri endofungal penghasil senyawa antibakteri, penentuan kurva tumbuh bakteri terpilih, ekstraksi metabolit bakteri, lalu uji aktivitas antibakteri dengan metode Disc Diffusion Assay (DDA), Minimum Inhibitory Concentration (MIC), dan Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Selanjutnya dilakukan identifikasi genus bakteri mengacu kepada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Ninth Edition* (1994) dan dilanjutkan dengan uji statistik untuk hasil uji antibakteri.

3.2. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah keseluruhan isolat bakteri endofungal pada hifa yang ada pada lamela tudung jamur *P. ostreatus*. Sampel yang digunakan yaitu jamur *P. ostreatus* berusia 25-35 hari dengan panjang tubuh buah \pm 10 cm (Benucci dkk., 2019). Pengambilan sampel jamur dilakukan di kumbung budidaya jamur di Jl. Situ Cileunca Kp. Dandang, RT01/RW01, Pulosari, Kec. Pangalengan, Kab. Bandung, Jawa Barat 40378. Bakteri patogen yang digunakan sebagai bakteri uji adalah *E. coli* dan jamur *C. albicans* yang didapat dari Laboratorium PT. Agridama Sinergi Inovasi (AGAVI).

3.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, FPMIPA UPI mulai dari bulan Januari 2024 hingga Juni 2024.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terlampir pada Lampiran 1. Semua alat serta bahan diperoleh dari Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA UPI.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Persiapan Alat dan Bahan

Sebelum memasuki tahap penelitian, dilakukan terlebih dahulu persiapan alat serta bahan yang meliputi penghitungan kebutuhan alat dan bahan, memastikan ketersediaan alat dan bahan, pembuatan stok media dan reagen (Lampiran 2), serta sterilisasi. Alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu dicuci dan keringkan lalu dilakukan sterilisasi basah menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan tekanan 1 atm pada suhu 121 °C (Cappuccino & Welsh, 2018).

3.5.2. Pengambilan Sampel dan Pengukuran Faktor Klimatik Lokasi Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada tiga media baglog yang ditumbuhi *P. ostreatus* yang tumbuh pada kondisi media dan faktor klimatik yang sama secara

acak (random sampling). Sampel satu, dua, dan tiga tersebut lalu diberi label A, B dan C.

Setelah pengambilan sampel, dilakukan pengukuran faktor klimatik lokasi sampling. Pengukuran faktor klimatik meliputi suhu dan kelembapan udara yang diukur menggunakan humidity meter dan intensitas cahaya yang diukur menggunakan lux meter. Selain itu dilakukan pengukuran faktor edafik media baglog meliputi suhu dan pH media yang diukur menggunakan termometer air raksa dan pH indikator. Terakhir, dilakukan pengukuran ketinggian lokasi menggunakan aplikasi GPS essentials di ponsel.

3.5.3. Isolasi Bakteri Endofungal

Metode sterilisasi mengikuti metode Hallman dkk. (2006). Isolasi bakteri endofungal dilakukan dengan mengambil bagian tubuh buah jamur *P. ostreatus* lalu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian diambil bagian lamela jamur sebanyak 1-5 g dan dilakukan pencucian dengan akuades steril. Kegiatan dilanjutkan dengan sterilisasi permukaan tubuh buah dengan merendamnya dalam alkohol 70% selama tiga menit, lalu dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali. Setelah itu dilakukan perendaman dalam larutan sodium hipoklorit (NaOCl) 1%, selama lima menit lalu bilas kembali menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali juga. Selanjutnya dilakukan perendaman kembali selama satu menit dalam alkohol 70%, kemudian direndam dalam akuades steril (Hallmann dkk., 2006). Untuk validasi sterilitas permukaan jamur, diambil sebanyak 100 µl akuades steril pada perendaman terakhir lalu diinokulasikan pada medium Nutrient agar (NA), kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam (Xiang dkk., 2017).

Sampel jamur yang sudah steril, masing-masing diambil bagian hifanya lalu dipotong kecil sekitar 5 mm³ lalu ditempelkan pada medium NA lalu inkubasi selama 24-48 jam di suhu 37 °C (Desriani dkk., 2014; Xu dkk., 2021). Setelah diinkubasi, koloni bakteri yang tumbuh dari masing-masing cawan (A, B, dan C) kemudian dikultur murni pada cawan berisi medium NA untuk identifikasi lebih lanjut dan pada NA miring sebagai stok.

3.5.4. Identifikasi Makroskopis & Mikroskopis

Identifikasi makroskopis dan mikroskopis bakteri meliputi pengamatan morfologi koloni, pengamatan bentuk sel, pewarnaan Gram, dan pewarnaan endospora.

1. Pengamatan morfologi koloni

Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati kenampakan morfologi koloni yang terbentuk dari isolat, meliputi bentuk koloni, tepian, elevasi, ukuran, warna, dan tekstur koloni. Identifikasi mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Ninth Edition* (Bergey, 1994). Sementara itu, pengamatan mikroskopis meliputi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, dan pengamatan bentuk sel yang semuanya diamati di bawah mikroskop (Cappuccino & Welsh, 2018).

2. Pewarnaan Gram

Prosedur pewarnaan Gram mengikuti prosedur Cappuccino & Welsh (2018) yaitu dilakukan dengan menggunakan empat pewarna berbeda. Pertama dibuat apusan bakteri di atas kaca objek dan dilakukan fiksasi dengan dilewatkan di atas api. Perlahan-lahan ditetesi/warnai dengan kristal violet lalu dibiarkan selama satu menit. Selanjutnya dilakukan pembilasan menggunakan akuades steril secara perlahan-lahan untuk membuang kelebihan warna. Setelah itu sediaan ditetesi oleh iodin secara perlahan lalu biarkan selama satu menit lalu dibilas kembali menggunakan akuades steril. Selanjutnya secara perlahan dibilas menggunakan alkohol 95% selama 30 detik untuk dekolorisasi lalu dibilas kembali menggunakan akuades steril. Tahap pewarnaan terakhir yaitu ditetesi dengan safranin dan dibiarkan selama 45 detik lalu dibilas menggunakan akuades steril secara perlahan dan kemudian dikeringkan menggunakan kertas bilbulus. Sediaan lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Bakteri yang tergolong ke dalam Gram positif akan berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah.

3. Pewarnaan Endospora

Pada pewarnaan endospora, sediaan mikroskopik isolat bakteri ditetesi dengan pewarna malakit hijau. Tahapan ini dilakukan di atas gelas kimia berisi air

yang dipanaskan selama tiga menit di atas *hot plate*. Sediaan kemudian didinginkan sebelum pembilasan dengan air mengalir. Setelah itu, safranin ditambahkan pada sediaan dan didiamkan selama 30 detik sebelum dibilas dengan air. Selanjutnya, sediaan diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000 kali. Sel vegetatif yang teramati akan tampak berwarna merah, sedangkan endospora akan mengikat warna hijau dari malakit hijau (Cappuccino & Welsh, 2018).

3.5.5. Uji Aktivitas Biokimia

Uji Aktivitas biokimia dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan aktivitas biokimianya dengan memanfaatkan fakta bahwa setiap bakteri memiliki karakteristik aktivitas biokimia yang berbeda (Cappuccino & Welsh, 2018). Metode pengujian aktivitas biokimia mengikuti prosedur Cappuccino & Welsh (2018).

1. Uji hidrolisis pati

Pada uji hidrolisis pati digunakan medium agar pati. Langkah pertama, isolat bakteri diinokulasikan pada permukaan agar pati dengan inokulasi garis. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil negatif akan menunjukkan warna biru-hitam setelah ditetesi lugol, sedangkan hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri setelah ditetesi lugol. Hasil positif mengindikasikan bakteri tersebut memiliki aktivitas enzim amilase yang dapat memecah pati menjadi monosakarida/disakarida (Cappuccino & Welsh, 2018).

2. Uji hidrolisis lipid

Pada uji hidrolisis lipid digunakan medium agar lipid yang sudah ditambahkan *neutral red* sebagai indikator. Isolat bakteri murni diinokulasikan pada permukaan agar dengan membuat garis tunggal, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil positif ditunjukkan dengan berubahnya warna koloni bakteri yang tumbuh menjadi merah. Hal tersebut disebabkan reaksi hidrolisis oleh bakteri menghasilkan asam lemak yang menyebabkan menurunnya pH medium menjadi asam (Cappuccino & Welsh, 2018).

3. Uji hidrolisis kasein

Uji hidrolisis kasein dilakukan dengan menginokulasikan isolat murni pada medium susu skim agar dengan inokulasi garis. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil positif ditandai dengan zona bening di sekitar pertumbuhan bakteri (Cappuccino & Welsh, 2018).

4. Uji hidrolisis gelatin

Uji hidrolisis gelatin dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri ke dalam media gelatin cair. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Lalu, isolat disimpan pada refrigerator suhu 4 °C selama 30 menit. Kultur yang tetap cair menunjukkan hasil positif gelatinase karena media yang mengandung gelatin akan padat pada suhu 4 °C. (Cappuccino & Welsh, 2018).

5. Uji fermentasi karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan menggunakan medium Nutrient Broth (NB) dengan penambahan fenol merah dan beberapa gula tertentu, seperti glukosa, sukrosa, dan laktosa. Satu ose isolat bakteri murni dimasukkan ke dalam medium NB (NB fenol merah glukosa, NB fenol merah sukrosa, dan NB fenol merah dektrosa) dalam tabung reaksi yang sudah diisi tabung durham. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Diamati perubahan warna medium dan keberadaan gelembung pada tabung. Jika warna medium berubah dari ungu menjadi kuning, hal tersebut menunjukkan bahwa ada produksi asam. Jika gelembung udara ditemukan pada tabung durham, itu menunjukkan bahwa fermentasi menghasilkan gas CO₂. Baik satu atau keduanya dari indikator tersebut menunjukkan hasil yang positif (Cappuccino & Welsh, 2018).

6. Uji katalase

Uji katalase dilakukan dengan membuat sediaan isolat bakteri pada kaca objek menggunakan jarum ose steril. Sediaan tersebut ditetesi H₂O₂ 3%. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara yang menandakan diproduksi gas O₂ hasil reduksi H₂O₂ dengan enzim katalase (Cappuccino & Welsh, 2018).

7. Uji susu litmus

Uji susu litmus dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri endofungal *P. ostreatus* ke dalam media susu litmus lalu diinkubasi selama 24 jam. Hasil yang akan muncul beragam, mulai dari positif asam yang ditandai dengan perubahan media menjadi warna merah muda, dihasilkannya dadih (*curd*), dihasilkannya gas, dihasilkannya alkalin yang ditandai dengan warna media yang semakin ungu/biru, atau juga hasil menunjukkan reaksi proteolisis yang ditandai dengan media berubah warna menjadi coklat (Cappuccino & Welsh, 2018).

8. *IMVIC (Indole, Methyl red, Voges-Proskauer, and Citrate) Tests*

IMVIC Tests merupakan serangkaian pengujian yang dilakukan khususnya untuk mengidentifikasi bakteri kelompok *Enterobacteriaceae* yang beberapa anggotanya merupakan bakteri patogen yang cukup kuat. *IMVIC Tests* meliputi uji *indole*, *methyl red*, *Voges-Proskauer*, dan *Citrate test* (Cappuccino & Welsh, 2018).

- a. Uji SIM (sulfida, indol, dan motilitas) dilakukan untuk menguji keberadaan sulfida, indol, dan motilitas bakteri. Isolat bakteri murni dimasukkan ke dalam setengah tabung berisi media SIM menggunakan jarum inokulasi, lalu kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, 10 tetes pereaksi kovac (dimetil aminobenzaldehid, n-amyl alkohol, dan HClp) ditambahkan ke dalam media kultur bakteri dan dihomogenkan. Terbentuknya lapisan cincin merah pada permukaan medium menunjukkan hasil positif indol, sedangkan lapisan kuning menunjukkan hasil negatif indol. Jika pertumbuhan bakteri terlihat ke segala arah, isolat bakteri dianggap motil. Apabila medium berubah menjadi hitam, hal tersebut menunjukkan diproduksinya H₂S (Cappuccino & Welsh, 2018).
- b. Methyl Red dan Voges-Proskauer (MR-VP) dilakukan pada Medium MR-VP *broth*. Biakan bakteri murni diinokulasikan pada medium MR-VP *broth* pada dua tabung lalu diberi label “VP” untuk uji Voges-Proskauer dan label “MR” pada tabung uji methyl red.

Biakan bakteri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Indikator positif uji methyl red yaitu medium yang berubah menjadi merah, sedangkan indikator positif uji Voges-Proskauer ditandai dengan perubahan warna medium menjadi merah atau merah muda setelah ditetesi reagen Barrit's A dan B (Cappuccino & Welsh, 2018).

- c. Uji sitrat dilakukan dengan menginokulasi isolat bakteri pada medium *simmons citrate*, kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium dari hijau menjadi biru tua (Cappuccino & Welsh, 2018).

3.5.6. Seleksi Isolat Bakteri Endofungal Penghasil Senyawa Antibakteri

Sebelum uji aktivitas antibakteri, dilakukan seleksi terlebih dahulu untuk mengetahui isolat bakteri endofungal mana saja yang menghasilkan senyawa antibakteri sehingga metabolit bakteri tersebut yang akan diuji pada uji aktivitas antibakteri. Pertama, isolat murni diinokulasikan untuk dilakukan peremajaan ke media NA lalu diinkubasi selama 24 jam. Bakteri uji yang digunakan ada dua jenis, yaitu bakteri *E. coli* dan fungi *C. albicans*.

Bakteri uji diremajakan terlebih dahulu dengan diinokulasikan ke media NB untuk *E. coli* dan pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB) untuk *C. albicans* lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C pada shaker inkubator. Setelah diinkubasi, sebanyak 1 ml kultur cair bakteri uji dituangkan ke dalam cawan petri steril. Selanjutnya cawan petri yang sudah berisi bakteri uji *E. coli* dituangkan media NA yang masih cair sebanyak 20 ml, sedangkan cawan yang berisi fungi uji *C. albicans* dituangkan 20 ml media *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar* (YEPDA) cair (da Silva dkk., 2008) lalu didiamkan hingga memadat. Isolat bakteri endofungal yang sudah diremajakan kemudian diinokulasikan ke media berisi bakteri uji dengan inokulasi titike, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Isolat yang menunjukkan zona hambat diseleksi untuk digunakan pada tahapan selanjutnya (Magharaniq dkk., 2014).

3.5.7. Kruva Tumbuh Bakteri Terpilih

Kurva tumbuh dibuat untuk mengetahui fase hidup bakteri meliputi fase lag, log, stasioner, dan kematian. Informasi terkait fase hidup bakteri pada bakteri uji penting menentukan fase bakteri aktif bertumbuh sehingga senyawa yang diuji bisa diketahui kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji (Sarles dkk., 1956). Pembuatan kurva tumbuh dilakukan dengan metode turbidimetri. Metode ini dilakukan dengan mengamati kenaikan nilai absorbansi kultur bakteri pada interval waktu tertentu. Besarnya nilai absorbansi mengindikasikan banyaknya jumlah sel, baik hidup maupun yang mati pada medium kultur bakteri (Poppi dkk., 2015).

Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri dimulai dengan subkultur isolat bakteri yang menunjukkan hasil positif dari uji antagonis sebelumnya. Isolat disubkultur pada 10 ml medium NB, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dengan shaker incubator dengan kecepatan 121 rpm. Setelah itu, kultur dimasukkan kembali ke dalam 50 ml medium NB dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C pada kecepatan 121 rpm hingga fase stasioner bakteri ditemukan. Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm pada setiap interval waktu dua jam (Cappuccino & Welsh, 2018). Nilai absorbansi menunjukkan kepadatan sel/*optical density* (OD). Kurva pertumbuhan bakteri diambil dari data pengukuran nilai absorbansi; sumbu x menunjukkan interval waktu observasi dan sumbu y menunjukkan nilai absorbansi (Poppi dkk., 2015; Pourramezan dkk., 2021; Sung & Jo, 2020).

3.5.8. Ekstraksi Metabolit Sekunder

Proses ekstraksi metabolit sekunder mengikuti metode Uche-Okereafor dkk. (2019). Bakteri endofungal yang telah terpilih dari proses seleksi kemudian diinokulasi satu ose pada 250 ml media NB dalam tabung flask 500 ml dan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan kecepatan 220 rpm hingga mencapai fase stasioner pertumbuhan bakteri (Pourramezan dkk., 2021; Sung & Jo, 2020). Setelah memasuki masing-masing-masing titik, kultur disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifugasi kemudian diambil bagian supernatan dan ditambahkan etil asetat (rasio 1:1) lalu di-*shaker* selama 2 jam. Hasil *shaker* akan terbentuk lapisan organik (etil asetat) lalu lapisan organik tersebut dipisahkan dengan lapisan airnya menggunakan corong pisah lalu dipekatkan menggunakan

rotary evaporator pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kasar (Uche-Okerefor dkk., 2019). Hasil dari *rotary evaporator* akan terbentuk ekstrak kering yang kemudian dilarutkan pada DMSO 10 % sebagai stok lalu diencerkan hingga mendapatkan konsentrasi 40,0 mg/ml, 10,0 mg/ml, dan 2,5 mg/ml (Makuwa & Serepa-Dlamini, 2021). Ekstrak ini yang akan digunakan dalam uji antibakteri dan antifungi. Perhitungan pengenceran ekstrak supernatan isolat bakteri endofungal dirinci pada Lampiran 2.

3.5.9. Penyediaan Bakteri Uji

Penyediaan inokulum bakteri uji *E. coli* dilakukan berdasarkan metode Ulloa-Urizar dkk. (2015). Isolat bakteri uji diinokulasikan pada medium NA steril dalam cawan petri kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37 °C. Koloni yang memiliki diameter 1 mm diambil sebanyak tiga koloni kemudian diinokulasikan pada medium NB steril dengan volume 15 mL. Hasil inokulasi kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam (Erdemoglu dkk., 2007). Setelah diinkubasi, kemudian dilakukan pengenceran sampai $1,5 \times 10^8$ dengan penyetaraan 0.5 McFarland (Ulloa-Urizar dkk., 2015).

Penyediaan fungi uji *C. albicans* dilakukan dengan menginokulasikan fungi pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) steril lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, koloni yang memiliki diameter 1 mm diambil sebanyak tiga koloni kemudian diinokulasikan pada 15 ml medium PDB steril lalu diinkubasi selama 12 jam (da Silva dkk., 2008; Listiyani, 2022). Inokulum kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm. Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan sel *yeast* dari spora. Bagian pelet kemudian dibilas dengan NaCl 0,85%. Setelah diencerkan, selanjutnya pelet disuspensikan kembali pada NaCl 0,85% lalu diencerkan sampai $1,5 \times 10^8$ dengan penyetaraan 0,5 McFarland (da Silva dkk., 2008).

3.5.10. Uji Antibakteri dengan Disc Diffusion Assay (DDA)

Uji DDA dilakukan menggunakan metode Kirby-Bauer dengan meneteskan ekstrak supernatan isolat bakteri endofungal pada kertas cakram setril yang sudah ditempelkan di atas medium agar yang berisi bakteri uji (Cappuccino & Welsh,

2018). hasil penyediaan inokulum bakteri uji diinokulasikan pada 9 ml medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) steril dalam cawan petri. Kertas cakram steril yang kemudian disimpan pada bagian atas medium agar menggunakan pinset secara aseptik lalu sebanyak 10 µL ekstrak supernatan dengan konsentrasi 40,0 mg/mL, 10,0 mg/mL, dan 2,5 mg/mL (Makuwa & Serepa-Dlamini, 2021) diteteskan pada kertas cakram. Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan DMSO 10%, sedangkan kontrol positif menggunakan ampicillin 50,0 µg/ml untuk bakteri *E. coli* (Rahmawati dkk., 2022) dan ketoconazole 30,0 mg/ml untuk *C. albicans* (Arifin, 2018). Pengulangan pada setiap perlakuan konsentrasi dilakukan sebanyak dua kali kemudian diinkubasi selama 24 jam di suhu 37 °C. Setelah masa inkubasi, dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang muncul di setiap perlakuan. Pengukuran zona hambat mengikuti rumus sebagai berikut (Rahmawati dkk., 2022):

$$\text{Zona Hambat} = \frac{(DV-DC)+(DH-DC)}{2}$$

Keterangan:

DV : Diameter vertikal zona bening

DC : Diameter cakram

DH : Diameter horizontal zona bening

Diameter zona hambat yang terbentuk kemudian dikelompokkan berdasarkan kategori kemampuan penghambatan menurut David & Stout (1971).

Tabel 3. 1. Tingkat aktivitas penghambatan zat antimikroba

Diameter Zona Hambat	Kriteria Tingkat Penghambatan
≤ 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
≥ 20 mm	Sangat Kuat

3.5.11. Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), dan Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

Uji MIC, MBC, dan MFC dilakukan menggunakan metode *two-fold serial broth microdilution*. *Minimum Inhibitory Concentration* merupakan konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen. (Nazareth dkk., 2019; Nxumalo dkk., 2020; Pourramezan dkk., 2021). Uji MIC dilakukan dengan membagi pelat mikrotirer 96 sumur menjadi tiga zona, yaitu kontrol positif, kontrol negatif, dan perlakuan.

Sumur pertama diisi kontrol positif yaitu 100 µl bakteri uji ditambah 100 µl ampisillin 50,0 µg/ml untuk *E. coli* dan 30,0 mg/ml untuk *C. albicans*. Sumur kedua diisi kontrol negatif yaitu 100 µl bakteri uji ditambah 100 µl DMSO 10%. Sumur ketiga sampai kedua belas diisi perlakuan. Perlakuan yang digunakan yaitu 100 µl bakteri uji ditambah 100 µl ekstrak supernatan bakteri endofungal dengan berbagai konsentrasi. Seri konsentrasi ekstrak supernatan bakteri dari sumur 12 sampai sumur 3 berturut-turut; 40,0 mg/mL, 20,0 mg/mL, 10,0 mg/mL, 5,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,375 mg/mL, 0,187 mg/mL, dan 0,093 mg/mL.

Pengenceran menggunakan metode *two-fold serial broth* dilakukan dengan menambahkan 100 µL ekstrak supernatan dengan konsentrasi 40,0 mg/mL ke dalam sumur ke-12, kemudian dihomogenkan dengan dipipet. Setelah campuran tersebut homogen, 100 µL diambil dari sumur ke-12 dan dipindahkan ke sumur ke-11, lalu dihomogenkan lagi. Proses ini diulangi hingga mencapai sumur ke-3, lalu di sumur ke-3 sebanyak 100 µL kemudian dibuang. Setelah itu, 100 µL inokulum mikroba uji ditambahkan ke dalam sumur ke-3 hingga sumur ke-12. Setiap perlakuan ekstrak diulang dua kali, dan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C (Uche-Okerefor dkk., 2019; Nxumalo dkk., 2020). Skema uji MIC dijelaskan pada Tabel 3.2.

Minimum Bactericidal Concentration (MBC) pada dasarnya sama dengan *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC) hanya saja berbeda jenis patogen uji. Uji MBC digunakan terhadap bakteri *E. coli*, sedangkan MFC digunakan terhadap

fungi *C. albicans*. Pada dasarnya MBC dan MFC adalah konsentrasi terendah yang dapat membunuh bakteri/fungi patogen. Uji ini menggunakan metode lempeng agar mengikuti Nxumalo dkk. (2020) dengan menginokulasikan 100 µl dari empat sumur terdekat dari konsentrasi terendah yang menunjukkan hasil positif uji MIC ke dalam medium MHA lalu diinkubasi 24 jam di suhu 37 °C (Uche-Okerefor dkk., 2019). Nilai MBC/MFC yaitu konsentrasi terendah yang tidak lagi terjadi pertumbuhan bakteri/fungi (Nazareth dkk., 2019; Stracquadanio dkk., 2020).

Tabel 3. 2. Rancangan penelitian

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
		Kontrol Positif	Kontrol Negatif	0,093 mg/ml	0,187 mg/ml	0,375 mg/ml	0,75 mg/ml	1,25 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	40 mg/ml	
A	A1.1													
B	A1.2													
C	A2.1													
D	A2.2													
E													
F														
G														
H														

3.6. Analisis data

Hasil Identifikasi bakteri dengan pengamatan makroskopis, mikroskopis, dan uji aktivitas biokimia kemudian dianalisis secara deskriptif dengan mengacu kepada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Ninth Edition* (1994). Hasil yang didapat berupa daftar genus bakteri yang dielaborasi secara deskriptif dengan mengacu kepada beberapa literatur yang ada.

Analisis statistika uji antibakteri digunakan uji LSD jika data terdistribusi normal dan homogen atau uji statistik non-parametrik Kruskal-Wallis jika data tidak homogen dan tidak terdistribusi normal untuk menguji perbandingan antara hasil rerata zona hambat metabolit isolat bakteri dengan zona hambat kontrol positif.. Sebelum dilakukan uji tersebut, perlu dilakukan uji homogenitas dengan Levene Test dan uji normalitas dengan Shapiro-Wilk.

3.7. Alur Penelitian

Alur penelitian Keragaman Bakteri Endofungal Jamur Tiram (*Pleurotus ostreatus*) dan Potensinya Sebagai Antibakteri dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3. 1. Alur penelitian